



## 氨基酸脱氢酶的催化机理、分子改造及合成应用

陈曦<sup>1</sup>, 高秀珍<sup>2</sup>, 朱敦明<sup>1\*</sup>

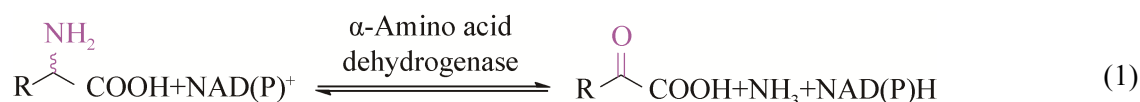
<sup>1</sup>中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业酶国家工程实验室, 天津市生物催化技术工程中心, 天津 300308

<sup>2</sup>山东理工大学生命科学院, 山东 淄博 255000

**摘要:** 氨基酸脱氢酶催化可逆的氨基酸氧化脱氨和酮酸的不对称还原胺化反应, 热力学上反应平衡倾向于生成氨基酸方向, 从原子经济学和对环境影响的角度来看, 是具有极大优势的氨基酸合成方法之一。本文将主要阐述近年来在 $\alpha$ -氨基酸脱氢酶催化机理、分子改造和合成应用方面的研究进展。

**关键词:** L-氨基酸脱氢酶, D-氨基酸脱氢酶, 催化机理, 酶工程, 合成应用

氨基酸脱氢酶 EC(1.4.1.X)催化可逆的氨基酸氧化脱氨和酮酸还原胺化反应, 是氨基酸合成和代谢途径中重要的酶类。目前研究得比较多的是 $\alpha$ -氨基酸脱氢酶, 催化反应如式(1)所示。以下



氨基酸脱氢酶催化酮酸的还原胺化反应时一般以氨作为氨基给体, 文献也报道了来源于 *Pseudomonas putida* 的丙氨酸脱氢酶可以利用甲胺作为氨基给体, 而不能利用氨作为氨基给体, 是一类很有趣的氨基酸脱氢酶, 在直接合成氨基取代的氨基酸时能表现出一定的优势<sup>[1-2]</sup>。京都大学的 Mihara 等克隆并异源表达了来源于 *P. putida*

在介绍几个特殊的氨基酸脱氢酶后, 将结合本课题组的工作对近年来在 $\alpha$ -氨基酸脱氢酶催化机理、分子改造和合成应用方面的研究进展作一阐述。

的 N-甲基-L-丙氨酸脱氢酶, 该酶独特的序列顺序, 表明其属于 NADP(H) 中一个新颖的超家族, 与其他的氨基酸脱氢酶不同<sup>[3]</sup>。

除了作用底物可以是 $\alpha$ -氨基酸外, 自然界也存在作用于氨基酸其他位置氨基的氨基酸脱氢酶。例如, 在赖氨酸降解途径中 L-erythro-3,5-二氨基己酸脱氢酶催化底物 3-位氨基的氧化生成 5-

基金项目: 国家自然科学基金(21472232, 21402109)

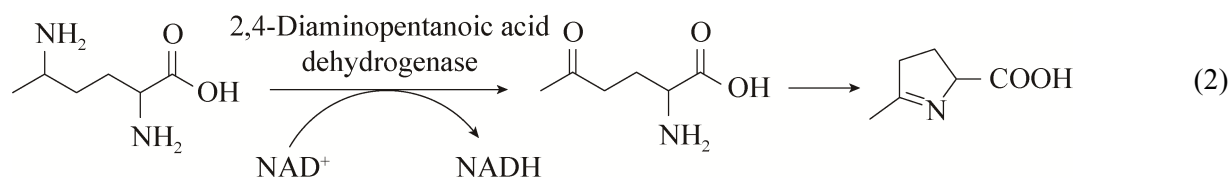
\*通信作者。Tel: +86-22-84861962; Fax: +86-22-84861996; E-mail: zhu\_dm@tib.cas.cn

收稿日期: 2017-04-04; 修回日期: 2017-04-29; 网络出版日期: 2017-05-25

氨基-3-酮基己酸,是目前发现的唯一 $\beta$ -氨基酸脱氢酶,该酶能够在梭菌属的 *Clostridium* SB4 和 *C. sticklandii* 中纯化得到<sup>[4-5]</sup>。虽然它们的酶学性质不尽相同,但是都仅对 L-erythro-3,5-二氨基己酸表现出明显活力。最近我们克隆表达了 2 个不同来源的 3,5-二氨基己酸脱氢酶,底物谱分析发现,这些酶对天然底物以外的 $\beta$ -氨基酸和 $\beta$ -酮酸没有活性或者活性很低。由于没有 3,5-二氨基己酸脱氢酶的蛋白晶体结构得到解析,我们通过基于 L- $\alpha$ -氨基酸脱氢酶催化机理推测和丙氨酸扫描确定了此酶的催化活性位点,结合模拟结构的功能域分析及鉴定的催化活性位点,构建了 85 个

逐点饱和扫描突变库,对这些突变库进行筛选获得对 $\beta$ -高甲硫氨酸, $\beta$ -苯丙氨酸和 $\beta$ -氨基丁酸等具有催化活性的 2 个突变体,并首次利用 $\beta$ -氨基酸脱氢酶催化 $\beta$ -酮酸还原胺化合成了相应的 $\beta$ -氨基酸<sup>[6]</sup>。

2,4-二氨基戊酸脱氢酶最初推测存在于鸟氨酸的代谢途径中,之后的研究表明,该酶可以利用 2,4-二氨基戊酸为底物,在氧化态辅因子 NAD<sup>+</sup> 存在下将其 4 位的氨基氧化为羰基<sup>[7]</sup>,该酶也可以作用于 2,5-二氨基己酸,催化 5 位的氨基氧化为羰基,产物会通过分子内的自发脱水反应生成环状亚胺化合物(式 2)。



## 1 氨基酸脱氢酶的催化机理

从 20 世纪 90 年代开始,氨基酸脱氢酶的晶体结构已有较多的报道,通过晶体结构分析、定点突变以及反应动力学分析等研究,提出了氨基酸脱氢酶催化反应的分子机理。对来源于 *Bacillus stearothermophilus* 的亮氨酸脱氢酶催化还原胺化的反应机理研究表明,两个高度保守的赖氨酸残基(Lys68 和 Lys80)参与催化反应,Lys80 带正电的 $\epsilon$ -氨基与底物酮酸的 $\alpha$ -羧基的氧原子形成氢键,而 Lys68 的 $\epsilon$ -氨基与酮酸的酮基以静电相互作用,氮进攻酮基的碳原子形成四面体中间体,Lys80 的 $\epsilon$ -氨基上的质子向氧转移形成水分子并失去,四面体中间体变成亚胺中间体;亚胺被来源于辅酶 NADH 的氢对映选择性还原,生成 L-氨基酸(图 1)。赖氨酸残基(Lys68 和 Lys80)与底物 $\alpha$ -酮基的氧原子相互作用使酮基碳原子的电子密度降低,便于

氮的进攻<sup>[8-9]</sup>。Vanhook 等通过对来源于 *Rhodococcus* sp. M4 的苯丙氨酸脱氢酶的晶体结构分析和反应动力学的研究,也提出了类似的催化反应机理<sup>[10-11]</sup>。同时,该苯丙氨酸脱氢酶与 3-苯基丙酮酸或 3-苯基-L-乳酸的复合物的晶体结构表明,3-苯基丙酮酸的 $\alpha$ -酮基氧原子与 Lys78 的 $\epsilon$ -氨基和 Gly40 的主链 N 原子形成强的氢键,使得底物的 $\alpha$ -酮基远离辅酶的烟酰胺环,阻止了羰基的还原或醇的脱氢反应,揭示了氨基酸脱氢酶没有醇脱氢酶催化活性的分子机理<sup>[11]</sup>。

通过对氨基酸脱氢酶的晶体结构分析,发现在 L-氨基酸脱氢酶和 D-氨基酸脱氢酶的催化过程中,底物与 NAD(P)H 的相对位置决定了氨基酸脱氢酶的立体选择性。分别以 L-苯丙氨酸脱氢酶和 meso-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶为例,如图 2 所示,当把辅因子 NAD(P)H 置于底物下方时,对于 L-苯丙氨酸脱氢酶来说,氨基(蓝色)则位于观察者方

向, 而羧基(桃红色)则远离观察者, 有利于反应发生的氨基是 L-构型(图 2-A)<sup>[10]</sup>; 与 L-构型氨基酸脱氢酶相反, 在 *meso*-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶的反应活性中心, 氨基(蓝色)位于远离观察者方向, 而羧基(桃红色)则位于观察者方向, 处于有利于反应发生的氨基是 D-构型(图 2-B)<sup>[12]</sup>。氨基酸脱氢酶底物结合口袋的氨基酸残基与底物的相互作用造成了底物手性碳上取代基团的朝向不同, 从而决定了反应的对映倾向性。

不同的氨基酸脱氢酶虽然遵循类似的催化反应机理, 但是它们通常具有较高的底物专一性。随着更多的氨基酸脱氢酶晶体结构的解析和动力

学模拟计算, 人们对于不同氨基酸的底物识别机制的理解也不断地深入<sup>[13-15]</sup>, 这为氨基酸脱氢酶的设计改造和合成应用奠定了理论基础。最近, 来源于 *Nostoc punctiforme* NIES-2108 的色氨酸脱氢酶的晶体结构分析发现该酶催化活性中心附近的疏水性氨基酸残基(Met40、Ala69、Ile74、Ile110、Leu288、Ile289 和 Tyr292)对于蛋白质的正确折叠起着非常重要的作用, 使得底物结合位点专一性识别色氨酸<sup>[16]</sup>。因而该酶具有对色氨酸的底物专一性, 对苯丙氨酸活性很低, 对其他天然的 L-氨基酸则没有活性, 能催化 3-吡啶丙酮酸的还原胺化反应, 而对苯基丙酮酸则没有催化活性<sup>[17]</sup>。

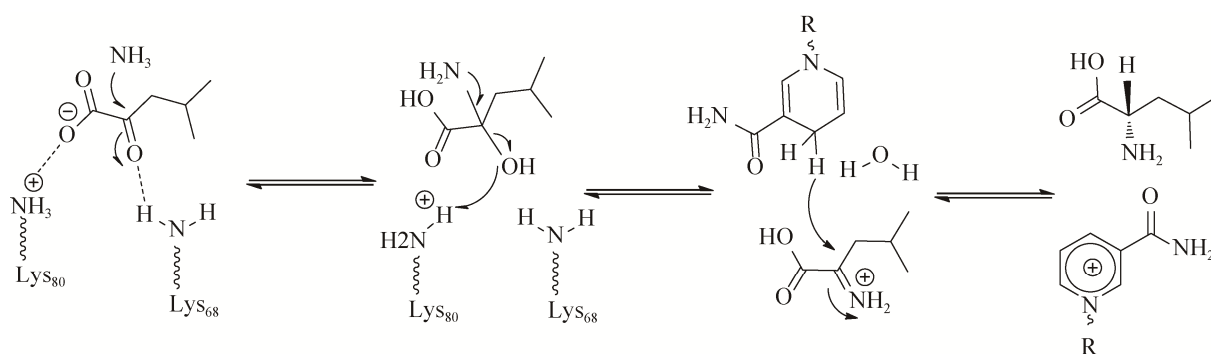


图 1. L-亮氨酸脱氢酶催化还原胺化的反应机理<sup>[8-9]</sup>

Figure 1. Reaction mechanism of reductive amination by L-leucine dehydrogenase<sup>[8-9]</sup>.

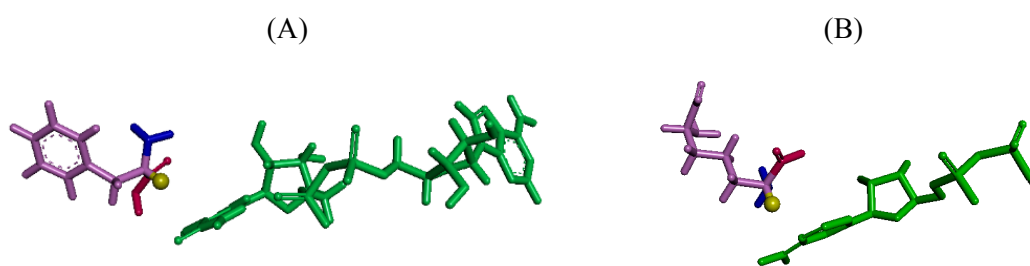


图 2. 辅酶与底物的相对位置<sup>[10,12]</sup>

Figure 2. The positioning of substrate and co-enzyme<sup>[10,12]</sup>. A: in the crystal structure of L-phenylalanine dehydrogenase (PDB ID: 1C1D); B: in the crystal structure of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase (PDB ID: 3WBF).

## 2 L-氨基酸脱氢酶的改造及合成应用

氨基酸脱氢酶催化酮酸的不对称还原胺化反应, 利用  $\text{NH}_3$  作为氨基给体, 辅酶  $\text{NAD(P)H}$  可以通过甲酸脱氢酶或葡萄糖脱氢酶来再生(图 3), 热力学上反应平衡倾向于产物方向, 有利于生成氨基酸, 同时因为反应的副产物是水, 从原子经济学和对环境影响的角度来看, 都具有极大的优越性<sup>[18-19]</sup>。

L-氨基酸脱氢酶的合成应用研究主要集中在 L-亮氨酸脱氢酶和 L-苯丙氨酸脱氢酶, 它们对不同结构的  $\alpha$ -酮酸分别具有较高的活性, 因此被用来合成了一系列的支链和芳香氨基酸。叔亮氨酸是合成药物的关键中间体, 利用 L-亮氨酸脱氢酶催化合成叔亮氨酸从 1990 年代就有报道, 目前该生物转化法已经应用于工业化生产, 成为利用氨基酸脱氢酶合成非天然氨基酸的典范。在提高产物浓度时, 为了避免由于底物本身不稳定造成的

损失, 在底物投加时采用了分批投料的方法, 使得产物浓度最终能够达到  $1.0 \text{ mol/L}$ , 分离产率和产物 ee 值分别达到 84% 和 >99%<sup>[20]</sup>。近年来, 不同来源的亮氨酸脱氢酶应用于 L-叔亮氨酸也见诸报道<sup>[21-24]</sup>。亮氨酸脱氢酶催化 2-羰基-8-烯-壬酸的还原胺化得到 (S)-2-氨基-8-烯-壬酸, 该氨基酸是合成默克公司开发的治疗 hepatitis C virus (HCV) 的候选药物的关键前体<sup>[25]</sup>。共表达亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的整细胞催化剂也已应用于 L-2-氨基-4,4-二甲基戊酸的合成, 在不外加辅酶的条件下  $88 \text{ g/L}$  的底物 24 h 内转化率大于 95%, 产物的 ee 值大于 99%<sup>[26]</sup>。来源于 *Thermoactinomyces intermedius* 的亮氨酸脱氢酶催化环丙基乙醛酸的还原胺化制备 (S)-环丙基甘氨酸,  $656 \text{ mmol/L}$  底物浓度下反应液中产物得率达到 99%<sup>[27]</sup>。利用来源于 *Bacillus stearothermophilus* 的 L-亮氨酸脱氢酶, 以  $^{15}\text{N}$  标记的氯化铵作为氨基给体合成一系列的  $^{15}\text{N}$  标记的 L-氨基酸<sup>[28]</sup>。

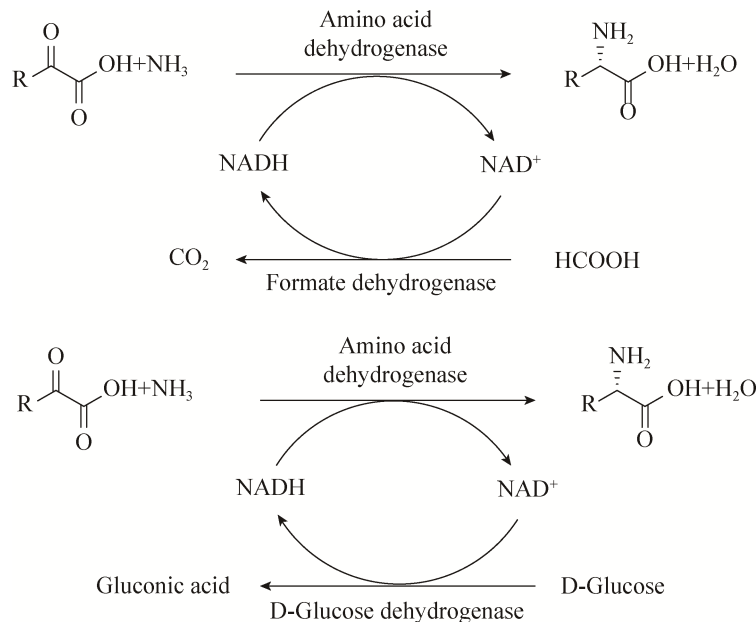


图 3. L-氨基酸脱氢酶催化  $\alpha$ -酮酸的还原胺化反应

Figure 3. L-Amino acid dehydrogenase catalyzes the reductive amination of  $\alpha$ -keto acids.

L-苯丙氨酸脱氢酶通常倾向于以芳香 $\alpha$ -酮酸为底物, 应用于合成 L-苯丙氨酸及类似的非天然氨基酸<sup>[19]</sup>。但是对于非天然的底物, 酶的催化活性较低, 所以需要野生型的 L-苯丙氨酸脱氢酶进行改造来提高其催化效率。Engel 研究组将来源于 *Bacillus sphaericus* 的 L-苯丙氨酸脱氢酶进行突变, 获得了多个底物谱不同的突变体, 并应用于合成苯环取代的 L-苯丙氨酸和其他不饱和非天然氨基酸<sup>[29-31]</sup>。将来源于 *Thermoactinomyces intermedius* 的 L-苯丙氨酸脱氢酶 C-端的 2 个氨基酸进行替换并延长 12 个氨基酸残基得到的突变体对天然底物苯基丙酮酸的活性明显降低, 但对 2-(3-羟基-1-金刚烷基)-2-氧乙酸的催化活性增强, 且应用于合成 2-(3-羟基-1-金刚烷基)-(2S)-氨基乙酸, 该氨基酸是合成一个治疗 II 型 diabetes mellitus 的候选药物 Saxagliptin 的关键中间体<sup>[32]</sup>。将酶催化剂固定化则可以提高其稳定性, 更利于合成应用。来源于 *Bacillus sphaericus* 的 L-苯丙氨酸脱氢酶突变体 N145A 固定在硅藻土上提高了酶对有机溶剂的耐受性和合成取代的苯基丙氨酸的效率<sup>[33]</sup>, 而来源于 *Rhodococcus* sp. M4 的 L-苯丙氨酸脱氢酶固定在 Eupergit CM 上增强了酶的热稳定性, 最佳反应温度提高到 50 °C, 并成功地应用于合成 (S)-2-氨基-4-苯基丁酸<sup>[34]</sup>。最近 Ni 研究小组报道了一种来源于 *Bacillus clausii* 的具有较宽底物谱的氨基酸脱氢酶, 对不同的芳香和脂肪族酮酸都具有催化活性, 并应用于制备 L-苯甘氨酸<sup>[35]</sup>。

L-氨基酸脱氢酶不仅应用于从 $\alpha$ -酮酸一步合成非天然氨基酸, 也可以将 L-氨基酸脱氢酶组合到代谢途径中, 建立新的氨基酸合成途径, 从而创建生产氨基酸的细胞工厂。在这样的思路下, 将外源的 L-丙氨酸脱氢酶基因导入大肠杆菌中, 利用廉价葡萄糖为原料合成 L-丙氨酸。例如, 将

来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 的 L-丙氨酸基因重组到 *Escherichia coli* W 中代替 D-乳酸脱氢酶, 经过一系列的基因操作后获得了生产 L-丙氨酸的菌株, 产物在发酵液中的浓度达到了 100 g/L 以上<sup>[36]</sup>。将苏氨酸氧化酶与 L-亮氨酸脱氢酶耦合, 建立体外多酶催化体系, 则可以实现从苏氨酸合成 L-2-氨基丁酸, 首先苏氨酸氧化酶将苏氨酸氧化成 2-酮基丁酸, L-亮氨酸脱氢酶将其还原胺化得到 L-2-氨基丁酸<sup>[37]</sup>。

随着对 L-氨基酸脱氢酶的催化机理和合成应用研究的深入, 新的科学问题提了出来, 也就是底物中与酮基相连的羧基是否是必需的? 如果可以通过改变底物结合空腔的氨基酸的性质来使得底物中与酮基相连的羧基可以是其他的基团, 如甲基、乙基等, 则该酶可以扩展到应用于手性胺的合成。出于这样的考虑, 人们开始了对 L-氨基酸脱氢酶更具有挑战性的改造, 使其具备了对原来没有活性的简单酮底物的催化能力, 成为氨脱氢酶。由于亮氨酸脱氢酶和苯丙氨酸脱氢酶具有几乎相同的二级结构, 依据来源于 *Rhodococcus* sp. M4 的苯丙氨酸脱氢酶的底物复合物晶体结构, Abrahamson 等分析确定了来源于 *Bacillus stearothermophilus* 的亮氨酸脱氢酶与底物相互作用的氨基酸残基, 对这些位点进行突变筛选, 获得突变体 K68S/E114V/N261I/V291C 对 (R)-2-苯乙胺的氧化方向的比活力为 0.58 U/mg, 苯乙酮还原胺化方向的比活力 0.058 U/mg; 环己胺氧化方向的比活力为 0.056 U/mg, 环己酮还原胺化方向的比活力 0.12 U/mg; 甲基异丁酮的还原胺化反应的比活力为 0.69 U/mg, 氧化脱氨反应的比活力为 2.64 U/mg。利用该突变体以葡萄糖脱氢酶再生辅酶 NADH, 能够将甲基异丁酮还原胺化生成 (R)-1,3-二甲基丁胺, 产率 92.5%, ee 值 99.8%<sup>[38]</sup>。



利用类似的改造思路，来源于 *Bacillus stearothermophilus* 的 L-苯丙氨酸脱氢酶通过将底物中羧基相互作用的碱性氨基酸 K77 和 N276 分别突变为丝氨酸和亮氨酸，该突变体对所筛选底物中苯氧基-2-丙酮表现出最高的比酶活 0.54 U/mg，对于脂肪酮，链状 2-己酮的比酶活最高，为 0.16 U/mg，而 3-己酮的比酶活仅为 2-己酮的 1%。采用葡萄糖脱氢酶再生辅酶 NADH，该突变体顺利地 4-氟苯乙酮转化为 (*R*)-4-氟苯乙胺<sup>[39]</sup>。将这两个胺脱氢酶的结构域进行洗牌改组得到新的突变酶，可以有效地催化苯乙酮和金刚烷基甲基酮的还原胺化，分别得到 (*R*)-苯乙胺和金刚烷基乙胺<sup>[40]</sup>。Li 研究组则通过对 *Rhodococcus* 来源的苯氨基酸脱氢酶的改造获得了高立体选择性的突变体 K66Q/S149G/N262C，催化苯丙酮和 4-苯基-2-丁酮还原胺化分别得到 (*R*)-3-苯基-2-丙胺和 (*R*)-4-苯基-2-丁胺，ee 值均大于 98%<sup>[41]</sup>。这些通过突变得到的胺脱氢酶被固定化或在水-有机双相体系中应用于手性胺的合成<sup>[42-43]</sup>。有趣的是，最近 Vergne-Vaxelaire 小组报道了来源于嗜热菌 *Petrotoga mobilis* 的野生型胺脱氢酶可以催化酮化合物的不对称还原胺化<sup>[44]</sup>。

醇脱氢酶可以利用醇为底物，在氧化态辅因子存在下，将羟基氧化为酮，而胺脱氢酶可以利用醇脱氢酶催化获得的酮作为底物，在还原态辅因子存在下，制备手性胺(图 4)。在这样的氧化-还原反应过程中，利用辅因子相同的氧化还原酶，在温和的反应条件下，实现醇到手性胺的转化，此类反应在有机合成中是难以实现的。最近有两篇文章报道利用醇脱氢酶与通过改造后的胺脱氢酶耦合，成功实现了将手性醇高效地转化为手性胺<sup>[45-46]</sup>。

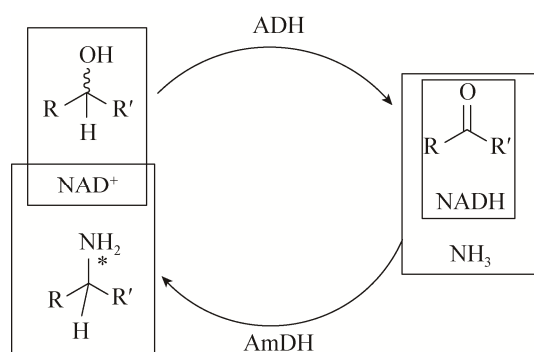


图 4. 醇脱氢酶和胺还原酶的借氢反应示意图<sup>[45-46]</sup>

Figure 4. Conversion of alcohol to chiral amine via hydrogen-borrowing approach catalyzed by an alcohol dehydrogenase and an amine dehydrogenase<sup>[45-46]</sup>.

### 3 D-氨基酸脱氢酶的改造及合成应用

D-氨基酸脱氢酶(D-amino acid dehydrogenase, EC 1.4.99.1)是一种膜绑定的蛋白，它可以催化一些 D-氨基酸的脱氨反应，生成对应的 2-酮酸和氨<sup>[47]</sup>。目前分离得到的 D-氨基酸脱氢酶根据其电子受体的不同分为两类：一类为 FAD 依赖型，如来源于 *Pseudomonas aeruginosa* 的 D-精氨酸脱氢酶<sup>[48]</sup>和来源于 *Helicobacter pylori* 的 D-氨基酸脱氢酶<sup>[47]</sup>；另一类是染料依赖型，该类 D-氨基酸脱氢酶均为膜结合蛋白，如来源于 *P. aeruginosa* 和 *E. coli* 的 D-氨基酸脱氢酶<sup>[49-50]</sup>。据文献报道，目前发现的 D-氨基酸脱氢酶只表现出氧化脱氨的活性，不能将酮酸底物进行还原胺化生成相应的 D-氨基酸<sup>[51]</sup>。该类 D-氨基酸脱氢酶作为膜蛋白，大大增加了人们获得高纯度、有活性的可溶性 D-氨基酸脱氢酶的难度，严重影响了对它们的研究及其合成应用<sup>[52]</sup>。因此，人们开发、利用 D-氨基酸脱氢酶合成 D-氨基酸的研究处于停滞不前的状态。近年来，人们对 D-氨基酸脱氢酶的研究主要集中在内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶 (*meso*-diaminopimelate

dehydrogenase DAPDH, EC 1.4.1.16)。

内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶是一类  $\text{NADP}^+$ -依赖型的氧化还原酶, 该酶存在于赖氨酸生物合成途径中, 在球形芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌等细菌中广泛存在<sup>[53-54]</sup>。此外, 植物中也存在内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶, 如从大豆中分离出来的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶<sup>[55]</sup>。该类酶能催化可逆的内消旋-二氨基庚二酸(*meso*-diaminopimelate, *meso*-DAP)的 D-手性碳上的氨基氧化脱氨, 生成 L-2-氨基-6-酮基庚酸(图 5)<sup>[53]</sup>。因此, 从催化反应的特点及过程来看, 我们可以将内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶视为一种 D-氨基酸脱氢酶。

就目前文献中已经报道的天然内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶而言, 可以分成两大类: (1) 对天然底物内消旋-二氨基庚二酸表现出高度的专一性, 如来源于 *Corynebacterium glutamicum* 和 *Ureibacillus thermosphaericus* 的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶(CgDAPDH 和 UtDAPDH)<sup>[52,54,56]</sup>。目前已知的野生型内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶大部分属于这一大类; (2) 对天然底物以外的其他 D-氨基酸表现出明显的催化活性, 催化多种 2-酮

酸还原胺化得到相应的 D-氨基酸, 来源于 *Symbiobacterium thermophilum* 的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶(StDAPDH)属于这一类, 对 D-丙氨酸等氨基酸和丙酮酸等 2-酮酸底物均表现出催化活性, 催化丙酮酸的还原胺化得到对应的 D-丙氨酸, ee 值达 99%<sup>[57]</sup>。该酶是第 1 个被发现的具有较宽底物谱的野生型内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶。同时, 该酶也是目前为止被发现的热稳定性最高的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶。

对 CgDAPDH、UtDAPDH 和 StDAPDH 等酶的氨基酸序列分析表明, 第一类中 CgDAPDH、UtDAPDH 等酶之间的序列同源性保持在 60%左右, 而 StDAPDH 与它们相比, 序列同源性在 30%左右。从氨基酸序列的长度来看, 第一类 DAPDH 的序列要明显长于第二类 DAPDH。晶体结构表明, CgDAPDH 和 UtDAPDH 中的  $\alpha 9$  和  $\alpha 10$  两个螺旋在 StDAPDH 中表现为一段缺失了 16 个氨基酸残基的较短的 loop 环<sup>[57-58]</sup>。对 CgDAPDH 与底物和抑制剂的相互作用模型分析可知<sup>[59]</sup>,  $\text{NADP}^+$  的二核苷酸一侧和底物 L-手性中心一侧暴露在溶剂中, 底物的 D-手性中心朝向  $\text{NADP}^+$  的烟酰胺环,

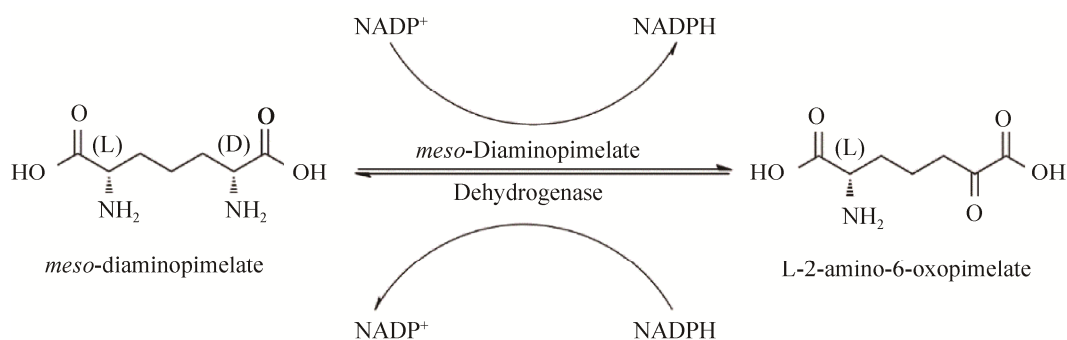


图 5. 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶催化的可逆反应

Figure 5. The reversible reaction catalyzed by *meso*-diaminopimelate dehydrogenase.

位于蛋白内部的疏水环境中。底物内消旋-二氨基庚二酸上的羧基与蛋白之间形成氢键,而氨基则主要是与有序的溶剂分子相互作用。因此,这些不同的极性相互作用决定了底物的羧基位于蛋白活性口袋中氨基酸残基所在的一侧,而底物的氨基则是位于溶剂可及一侧,从而导致了底物与蛋白结合时的唯一构象,从而表现出催化过程中对D-手性中心的立体专一性。底物的这种定位使得底物D-氨基酸手性中心的 $\alpha$ 氢原子直接转移到NADP<sup>+</sup>的烟酰胺环的底物的C4'原子上,形成亚胺中间态,然后完成催化过程<sup>[60]</sup>。酶的催化过程遵循“有序的动力学反应机制(ordered kinetic mechanism)”,不过,催化过程中底物和辅酶的进入顺序并不相同,研究表明来源于*Bacillus sphaericus*的DAPDH(BsDAPDH)和StDAPDH在催化时首先结合NADP(H),而CgDAPDH则是首先结合底物<sup>[59,61-62]</sup>。底物/辅酶进入催化中心之后,酶的结构域发生运动,使酶的催化口袋由开放状态变为闭合状态,导致催化反应的发生。尽管晶体结构分析表明CgDAPDH和UtDAPDH为二聚体,StDAPDH为六聚体,但是它们与催化相关的残基都是一样的。不同的是,StDAPDH中存在两个底物结合通道,一个较大的通道允许天然底物内消旋-二氨基庚二酸的进入,另一个较小的通道则适合丙酮酸等较小的底物出入,这2个通道位于M152位点的两侧,而M152位点则与Asp92和Asn253存在相互作用,可能影响到了StDAPDH结构域的运动及催化性质,从而揭示了StDAPDH具有较宽底物谱的分子基础<sup>[61]</sup>。

内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶的应用,主要是体现在利用其进行2-酮酸的不对称还原胺化合成D-氨基酸。D-氨基酸具有非天然L-氨基酸所不具

有的功能,在药物合成(医药和农药)、食品、化妆品、饲料等方面具有广泛的用途<sup>[63]</sup>。在StDAPDH被发现之前,鉴于内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶对底物*meso*-DAP表现出来的高度的D-立体选择性,研究人员尝试对DAPDH进行了蛋白质工程改造,以期获得具有D-氨基酸合成能力的突变体。Vedha-Peters等综合采用了随机突变和定点突变的技术,对CgDAPDH进行了三轮突变体库的构建及约100000个突变子的筛选后,获得了突变体BC621,对环己基丙酮酸的还原胺化的活性最高,相对野生型提高了625倍。利用冻干后的酶粉作为催化剂,与葡萄糖脱氢酶(GDH)/葡萄糖辅酶循环体系耦合,经24h反应后,环己基丙酮酸到D-环己基丙氨酸的转化率>95%,产物的ee值>99%<sup>[52]</sup>。该突变体中含有5个位点的氨基酸替换,包括Arg196Met、Thr170Ile、His244Asn、Gln150Leu和Asp155Gly,其中仅His244和Gln150为活性位点。随后,多个研究组对不同来源的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶的同位点进行同样的氨基酸替换,获取目标D-氨基酸脱氢酶。Ohshima等以UtDAPDH为模板进行氨基酸位点的替换,获得了具有较宽底物谱的突变体,采用葡萄糖脱氢酶/葡萄糖的辅酶循环体系,在65°C、pH 10.5的条件下,以2-羰基-4-甲基戊酸为底物,反应2h,以>99%的产率和光学纯度制备了D-亮氨酸,并应用于制备具有不同元素的稳定同位素标记的带侧链的D-氨基酸,该类化合物在临床上可以用于基于核磁共振法或傅里叶变换红外线光谱法的示踪分析<sup>[64]</sup>。为了制备(*R*)-5,5,5-三氟戊氨酸,Hanson等对BsDAPDH的编码基因进行了碱基替换,引入CgDAPDH BC621中同样的突变。为了避免宿主细胞的内源酶将底物转化成



(S)-5,5,5-三氟戊氨酸, 他们敲除了宿主内的谷氨酸脱氢酶基因, 将 BsDAPDH 的突变酶和葡萄糖脱氢酶的编码基因构建重组质粒后, 导入改造过的大肠杆菌, 获得了共表达 BsDAPDH 突变酶和葡萄糖脱氢酶的整细胞催化剂, 以 89% 的产率制备了 100% 的光学纯(R)-5,5,5-三氟戊氨酸<sup>[65]</sup>。为了探索这些突变能够改变内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶的底物谱的分子基础, 我们对来源于 *Clostridium tetani* E88 的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶(CtDAPDH)进行了同样的突变, 并研究了突变体与内消旋-二氨基庚二酸(*meso*-DAP)、D-亮氨酸或 2-羰基-4-甲基戊酸的复合物的晶体结构, 发现将这些亲水性的氨基酸残基突变成疏水性的氨基酸后, *meso*-DAP 不能进入到突变酶的底物结合位点, 而是停留在蛋白质表面附近的位置, 这与突变酶对天然底物的催化活性很低一致; D-亮氨酸和 2-羰基-4-甲基戊酸则进入到底物结合位点, 处于发生反应的正确构象, 因而突变酶对这些底物表现较高的催化活性<sup>[66]</sup>。

StDAPDH 是目前发现具有较宽底物谱的热稳定性最高的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶, 并且也已解析其晶体结构, 这为通过设计改造获得具有合成应用潜力的突变酶提供了一个很好的起始酶。StDAPDH 的晶体结构表明其底物结合结构域中在底物 L-手性中心周围的氨基酸残基是 Phe146、Thr171、Arg181 和 His227, 对这 4 个位点分别进行定点饱和突变, 以大位阻底物苯基丙酮酸为底物, 对突变文库进行筛选后, 得到了 T171P、T171S、R181F、H227C、H227V 五个活性明显提高的突变体, 其中 H227V 对苯基丙酮酸的比活相对野生型提高了 35 倍, 且所有突变体催化得到的 D-苯丙氨酸的 ee 值均大于 99%。对所有

突变体及野生型进行了反应动力学分析, 发现突变的引入并没有造成酶对底物亲和力的改变, 突变体活性的提高则是由酶催化效率提高导致的。对 H227V 和 WT 进行分子动力学模拟表明, 突变后底物 C<sub>α</sub> 与 NADP<sup>+</sup> 的烟酰胺环上的 C<sub>4'</sub> 之间的原子距离由 4.8 Å 缩短到 3.6 Å, 与比活性结果一致。这些结果表明, 底物 L-手性中心周围的氨基酸残基的改变可以改变底物范围和活性, 而不影响反应的立体选择性。因此, 通过对 StDAPDH 底物 L-手性中心周围的氨基酸残基进行设计改造, 可以获得不同的 D-氨基酸脱氢酶, 合成不同的 D-氨基酸, 从而建立一个利用氨基酸脱氢酶催化合成 D-氨基酸的平台技术<sup>[67]</sup>。

## 4 总结和展望

光学纯的氨基酸和手性胺是非常重要的高值化学品, 广泛应用于医药、农药、化妆品、食品、饲料等领域, 氨基酸脱氢酶催化酮酸的立体选择性还原胺化反应合成光学纯的氨基酸和手性胺具有原子经济性和对环境影响上的优势, 因此, 可以预期对氨基酸脱氢酶催化机理、分子改造和合成应用的研究将是生物催化领域的一个热点。研究的重点将主要在以下几个方面: (1) 自然界中存在的、可以作用于具有不同结构特征的底物的氨基酸脱氢酶的发现, 及其催化性质和催化机理的研究; (2) 对已知氨基酸脱氢酶的分子改造, 以期获得可以催化具有各种结构特征的羰基化合物的不对称还原胺化, 实现目标光学纯氨基酸和手性胺的绿色合成; (3) 借鉴生物体内氨基酸的合成途径, 设计创建新颖的多酶催化体系, 实现从简单易得原料“一锅法”高效合成目标光学纯氨基酸和手性胺。

## 参考文献

- [1] Lin MC, Wagner C. Purification and characterization of *N*-methylalanine dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(10): 3746–3751.
- [2] Muramatsu H, Mihara H, Kakutani R, Yasuda M, Ueda M, Kurihara T, Esaki N. Enzymatic synthesis of *N*-methyl-L-phenylalanine by a novel enzyme, *N*-methyl-L-amino acid dehydrogenase, from *Pseudomonas putida*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15(18): 2841–2843.
- [3] Mihara H, Muramatsu H, Kakutani R, Yasuda M, Ueda M, Kurihara T, Esaki N. *N*-methyl-L-amino acid dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. A novel member of an unusual NAD(P)-dependent oxidoreductase superfamily. *The FEBS Journal*, 2005, 272(5): 1117–1123.
- [4] Baker JJ, Jeng I, Barker HA. Purification and properties of L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase from a lysine-fermenting *Clostridium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(23): 7724–7734.
- [5] Baker JJ, van der Drift C. Purification and properties of L-erythro-3,5-diaminohexanoate dehydrogenase from *Clostridium sticklandii*. *Biochemistry*, 1974, 13(2): 292–299.
- [6] Zhang DL, Chen X, Zhang R, Yao PY, Wu QQ, Zhu DM. Development of  $\beta$ -amino acid dehydrogenase for the synthesis of  $\beta$ -amino acids via reductive amination of  $\beta$ -keto acids. *ACS Catalysis*, 2015, 5(4): 2220–2224.
- [7] Tsuda Y, Friedmann HC. Ornithine metabolism by *Clostridium sticklandii*: oxidation of ornithine to 2-amino-4-ketopentanoic acid via 2,4-diaminopentanoic acid; participation of B<sub>12</sub> coenzyme, pyridoxal phosphate, and pyridine nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 1970, 245(22): 5914–5926.
- [8] Sekimoto T, Fukui T, Tanizawa K. Involvement of conserved lysine 68 of *Bacillus stearothermophilus* leucine dehydrogenase in substrate binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(10): 7262–7266.
- [9] Sekimoto T, Matsuyama T, Fukui T, Tanizawa K. Evidence for lysine 80 as general base catalyst of leucine dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(36): 27039–27045.
- [10] Vanhooke JL, Thoden JB, Brunhuber NMW, Blanchard JS, Holden HM. Phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4: High-resolution X-ray analyses of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism. *Biochemistry*, 1999, 38(8): 2326–2339.
- [11] Brunhuber NMW, Thoden JB, Blanchard JS, Vanhooke JL. *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase: Kinetics, mechanism, and structural basis for catalytic specificity. *Biochemistry*, 2000, 39(31): 9174–9187.
- [12] Scapin G, Reddy SG, Blanchard JS. Three-dimensional structure of *meso*-diaminopimelic acid dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemistry*, 1996, 35(42): 13540–13551.
- [13] Zhao Y, Wakamatsu T, Doi K, Sakuraba H, Ohshima T. A psychrophilic leucine dehydrogenase from *Sporosarcina psychrophila*: Purification, characterization, gene sequencing and crystal structure analysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 83: 65–72.
- [14] Tripathi SM, Ramachandran R. Crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen alanine dehydrogenase (Rv2780) in apo and ternary complex forms captures “open” and “closed” enzyme conformations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2008, 72(3): 1089–1095.
- [15] Baker PJ, Waugh ML, Wang XG, Stillman TJ, Turnbull AP, Engel PC, Rice DW. Determinants of substrate specificity in the superfamily of amino acid dehydrogenases. *Biochemistry*, 1997, 36(51): 16109–16115.
- [16] Wakamatsu T, Sakuraba H, Kitamura M, Hakumai Y, Fukui K, Ohnishi K, Ashiuchi M, Ohshima T. Structural insights into L-tryptophan dehydrogenase from a photoautotrophic cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(2): e02710–16.
- [17] Ogura R, Wakamatsu T, Mutaguchi Y, Doi K, Ohshima T. Biochemical characterization of an L-tryptophan dehydrogenase from the photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 60: 40–46.
- [18] Drauz K, Gröger H, May O. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [19] Zhu DM, Hua L. Biocatalytic asymmetric amination of carbonyl functional groups – a synthetic biology approach to organic chemistry. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(10): 1420–1431.
- [20] Menzel A, Werner H, Altenbuchner J, Gröger H. From enzymes to “designer bugs” in reductive amination: A new process for the synthesis of L-*tert*-leucine using a whole cell-catalyst. *Engineering in Life Sciences*, 2004, 4(6): 573–576.
- [21] Li J, Pan J, Zhang J, Xu JH. Stereoselective synthesis of L-*tert*-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 105: 11–17.
- [22] Liu WM, Ma HM, Luo JX, Shen WH, Xu X, Li S, Hu Y, Huang H. Efficient synthesis of L-*tert*-leucine through reductive amination using leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase coexpressed in recombinant *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 91: 204–209.

- [23] Zhu L, Wu Z, Jin JM, Tang SY. Directed evolution of leucine dehydrogenase for improved efficiency of L-tert-leucine synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(13): 5805–5813.
- [24] Jiang W, Sun DF, Lu JX, Wang YL, Wang SZ, Zhang YH, Fang BS. A cold-adapted leucine dehydrogenase from marine bacterium *Alcanivorax dieselolei*: Characterization and L-tert-leucine production. *Engineering in Life Sciences*, 2016, 16(3): 283–289.
- [25] Park J, Moore JC, Xu F. Asymmetric synthesis of iso-boc (S)-2-amino-8-nonenoic acid in one through-process. *Organic Process Research & Development*, 2016, 20(1): 76–80.
- [26] Gröger H, May O, Werner H, Menzel A, Altenbuchner J. A “second-generation process” for the synthesis of L-neopentylglycine: Asymmetric reductive amination using a recombinant whole cell catalyst. *Organic Process Research & Development*, 2006, 10(3): 666–669.
- [27] Parker WL, Hanson RL, Goldberg SL, Tully TP, Goswami A. Preparation of (S)-1-cyclopropyl-2-methoxyethanamine by a chemoenzymatic route using leucine dehydrogenase. *Organic Process Research & Development*, 2012, 16(3): 464–469.
- [28] Chiriac M, Lupan I, Bucurenci N, Popescu O, Palibroda N. Stereoselective synthesis of L-[<sup>15</sup>N] amino acids with glucose dehydrogenase and galactose mutarotase as NADH regenerating system. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2008, 51(4): 171–174.
- [29] Busca P, Paradisi F, Moynihan E, Maguire AR, Engel PC. Enantioselective synthesis of non-natural amino acids using phenylalanine dehydrogenases modified by site-directed mutagenesis. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, 2(18): 2684–2691.
- [30] Paradisi F, Collins S, Maguire AR, Engel PC. Phenylalanine dehydrogenase mutants: Efficient biocatalysts for synthesis of non-natural phenylalanine derivatives. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(2): 408–411.
- [31] Chen SH, Engel PC. Efficient screening for new amino acid dehydrogenase activity: Directed evolution of *Bacillus sphaericus* phenylalanine dehydrogenase towards activity with an unsaturated non-natural amino acid. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142(2): 127–134.
- [32] Hanson RL, Goldberg SL, Brzozowski DB, Tully TP, Cazzulino D, Parker WL, Lyngberg OK, Vu TC, Wong MK, Patel RN. Preparation of an amino acid intermediate for the dipeptidyl peptidase IV inhibitor, Saxagliptin, using a modified phenylalanine dehydrogenase. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, 349(8/9): 1369–1378.
- [33] Cainelli G, Engel PC, Galletti P, Giacomini D, Gualandi A, Paradisi F. Engineered phenylalanine dehydrogenase in organic solvents: Homogeneous and biphasic enzymatic reactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2005, 3(24): 4316–4320.
- [34] Ahmad AL, Low EM, Shukor SRA. Immobilization of phenylalanine dehydrogenase onto Eupergit CM for the synthesis of (S)-2-amino-4-phenylbutyric acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 88: 26–31.
- [35] Cheng J, Xu GC, Han RZ, Dong JJ, Ni Y. Efficient access to L-phenylglycine using a newly identified amino acid dehydrogenase from *Bacillus clausii*. *RSC Advances*, 2016, 6(84): 80557–80563.
- [36] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 355–366.
- [37] Tao RS, Jiang Y, Zhu FY, Yang S. A one-pot system for production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine by L-threonine deaminase and a NADH-regeneration system based on L-leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(4): 835–841.
- [38] Abrahamson MJ, Vázquez-Figueroa E, Woodall NB, Moore JC, Bommarius AS. Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(16): 3969–3972.
- [39] Abrahamson MJ, Wong JW, Bommarius AS. The evolution of an amine dehydrogenase biocatalyst for the asymmetric production of chiral amines. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2013, 355(9): 1780–1786.
- [40] Bommarius BR, Schürmann M, Bommarius AS. A novel chimeric amine dehydrogenase shows altered substrate specificity compared to its parent enzymes. *Chemical Communications*, 2014, 50(95): 14953–14955.
- [41] Ye LJ, Toh HH, Yang Y, Adams JP, Snajdrova R, Li Z. Engineering of amine dehydrogenase for asymmetric reductive amination of ketone by evolving *Rhodococcus* phenylalanine dehydrogenase. *ACS Catalysis*, 2015, 5(2): 1119–1122.
- [42] Liu J, Pang BQW, Adams JP, Snajdrova R, Li Z. Coupled immobilized amine dehydrogenase and glucose dehydrogenase for asymmetric synthesis of amines by reductive amination with cofactor recycling. *ChemCatChem*, 2017, 9(3): 425–431.
- [43] Au SK, Bommarius BR, Bommarius AS. Biphasic reaction system allows for conversion of hydrophobic substrates by amine dehydrogenases. *ACS Catalysis*, 2014, 4(11): 4021–4026.
- [44] Mayol O, David S, Darii E, Debarb A, Mariage A, Pellouin V, Petit JL, Salanoubat M, de Berardinis V, Zapparucha A, Vergne-Vaxelaire C. Asymmetric reductive amination by a wild-type amine dehydrogenase from the thermophilic

- bacteria *Petrogala mobilis*. *Catalysis Science & Technology*, 2016, 6(20): 7421–7428.
- [45] Mutti FG, Knaus T, Scrutton NS, Breuer M, Turner NJ. Conversion of alcohols to enantiopure amines through dual-enzyme hydrogen-borrowing cascades. *Science*, 2015, 349(6255): 1525–1529.
- [46] Chen FF, Liu YY, Zheng GW, Xu JH. Asymmetric amination of secondary alcohols by using a redox-neutral two-enzyme cascade. *ChemCatChem*, 2015, 7(23): 3838–3841.
- [47] Tanigawa M, Shinohara T, Saito M, Nishimura K, Hasegawa Y, Wakabayashi S, Ishizuka M, Nagata Y. D-Amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Amino Acids*, 2010, 38(1): 247–255.
- [48] Fu GX, Yuan HL, Li CR, Lu CD, Gadda G, Weber IT. Conformational changes and substrate recognition in *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase. *Biochemistry*, 2010, 49(39): 8535–8545.
- [49] Marshall VP, Sokatch JR. Oxidation of D-amino acids by a particulate enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1968, 95(4): 1419–1424.
- [50] Olsiewski PJ, Kaczorowski GJ, Walsh C. Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(10): 4487–4494.
- [51] Hummel W, Gröger H. Reductive amination of keto acids//Drauz K, Gröger H, May O. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [52] Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, Novick SJ. Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(33): 10923–10929.
- [53] Misono H, Togawa H, Yamamoto T, Soda K. *meso*- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -Diaminopimelate D-dehydrogenase: distribution and the reaction product. *Journal of Bacteriology*, 1979, 137(1): 22–27.
- [54] Misono H, Ogasawara M, Nagasaki S. Characterization of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50(11): 2729–2734.
- [55] Wenko LK, Treick RW, Wilson KG. Isolation and characterization of a gene encoding *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Glycine max*. *Plant Molecular Biology*, 1985, 4(4): 197–204.
- [56] Akita H, Fujino Y, Doi K, Ohshima T. Highly stable *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing. *AMB Express*, 2011, 1(1): 43.
- [57] Gao XZ, Chen X, Liu WD, Feng JH, Wu QQ, Hua L, Zhu DM. A novel *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*: Overexpression, characterization, and potential for D-amino acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8595–8600.
- [58] Akita H, Seto T, Ohshima T, Sakuraba H. Structural insight into the thermostable NADP<sup>+</sup>-dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus*. *Acta Crystallographica Section D*, 2015, 71(5): 1136–1146.
- [59] Scapin G, Cirilli M, Reddy SG, Gao Y, Vederas JC, Blanchard JS. Substrate and inhibitor binding sites in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase. *Biochemistry*, 1998, 37(10): 3278–3285.
- [60] Abbott SD, Lane-Bell P, Sidhu KPS, Vederas JC. Synthesis and testing of heterocyclic analogs of diaminopimelic acid (DAP) as inhibitors of DAP dehydrogenase and DAP epimerase. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(15): 6513–6520.
- [61] Liu WD, Li Z, Huang CH, Guo RT, Zhao LM, Zhang DL, Chen X, Wu QQ, Zhu DM. Structural and mutational studies on the unusual substrate specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*. *ChemBioChem*, 2014, 15(2): 217–222.
- [62] Sakamoto S, Seki M, Nagata S, Misono H. Cloning, sequencing, and expression of the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase gene from *Bacillus sphaericus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 12(1/6): 85–92.
- [63] Martínez-Rodríguez S, Martínez-Gómez AI, Rodríguez-Vico F, Clemente-Jiménez JM, Las Heras-Vázquez FJ. Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: An overview. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7(6): 1531–1548.
- [64] Akita H, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1135–1143.
- [65] Hanson RL, Johnston RM, Goldberg SL, Parker WL, Goswami A. Enzymatic preparation of an *R*-amino acid intermediate for a  $\gamma$ -secretase inhibitor. *Organic Process Research & Development*, 2013, 17(4): 693–700.
- [66] Liu WD, Guo RT, Chen X, Li Z, Gao XZ, Huang CH, Wu QQ, Feng JH, Zhu DM. Structural analysis reveals the substrate-binding mechanism for the expanded substrate specificity of mutant *meso*-diaminopimelate dehydrogenase. *ChemBioChem*, 2015, 16(6): 924–929.
- [67] Gao XZ, Huang F, Feng JH, Chen X, Zhang HL, Wang ZX,

Wu QQ, Zhu DM. Engineering the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* by site

saturation mutagenesis for D-phenylalanine synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5078–5081.

## Catalysis, engineering and application of amino acid dehydrogenases

Xi Chen<sup>1</sup>, Xiuzhen Gao<sup>2</sup>, Dunming Zhu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Engineering Research Center of Biocatalytic Technology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

<sup>2</sup> College of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255000, Shandong Province, China

**Abstract:** Amino acid dehydrogenases catalyze the reversible oxidative deamination of amino acids and reductive amination of keto acids, with thermodynamic equilibrium favoring the reductive amination direction. This is one of the most attractive methods for the synthesis of amino acids with high atomic economy and less environmental impact. This review addresses recent advances in studies on reaction mechanism, molecular modification and synthetic applications of amino acid dehydrogenases.

**Keywords:** L-Amino acid dehydrogenase, D-Amino acid dehydrogenase, catalytic mechanism, enzyme engineering, synthetic application

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21472232, 21402109)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-84861962; Fax: +86-22-84861996; E-mail: zhu\_dm@tib.cas.cn

Received: 4 April 2017; Revised: 29 April 2017; Published online: 25 May 2017